

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02897
(22) Date de dépôt international: 24 novembre 1999 (24.11.99)
(30) Données relatives à la priorité: 98/14858 25 novembre 1998 (25.11.98) FR
(71) Déposant (pour tous les États désignés) et/ou US/US: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (FR/FR); 3, rue Michel-Auge, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs: et
(73) Inventeurs/déposants (US seulement): IIRSCIL, Françoise (FR/FR); 20, rue Victor Camille, F-94110 Arcueil (FR); IIAEFFNER, Astid (FR/FR); 14, avenue de Celles, F-92160 Meudon la Forêt (FR).

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles et.; Grosset-Fournier & Demachy, 20, rue de Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

Publié
Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Titre: NF- κ B ACTIVATION INHIBITORS, AND THEIR PHARMACEUTICAL USES

(54) Titre: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

The invention concerns the use of the nuclear factor NF- κ B inhibitors for treating cancer, and more particularly malignant haemopathy and solid tumours, as well as product containing a NF- κ B activation inhibitor compound and a cytotoxic molecule capable of activating the NF- κ B factor as a combined preparation for simultaneous, separate or prolonged use for treating said pathologies.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs du facteur nucléaire NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides, ainsi que les produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée, ou étalée dans le temps pour le traitement desdites pathologies.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les États parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovaquie
AM	Arménie	FI	Finlande	LU	Luxembourg	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LV	Lettonie	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	MC	Monaco	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MD	Maldives	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MG	Madagascar	TG	Togo
BB	Barbade	GR	Grèce	ML	Mali	TJ	Tadjikistan
BF	Burkina Faso	GU	Guam	MR	Mauritanie	TM	Turkménistan
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MT	Malte	TR	Turquie
BI	Burundi	IE	Irlande	NI	Népal	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IS	Islande	NL	Pays-Bas	UG	Ouganda
BO	Bolivie	IT	Italie	NO	Norvège	US	États-Unis d'Amérique
BR	Bразил	JP	Japon	NZ	Nouvelle-Zélande	UZ	Ouzbékistan
CA	Canada	KE	Kenya	PL	Pologne	VN	Viet Nam
CF	République centrafricaine	KG	Kirghizistan	PT	Portugal	YU	Yougoslavie
CG	Congo	KH	Koweït	RU	Russie	ZW	Zimbabwe
CH	Suisse	LA	Laos	SD	Soudan		
CI	Côte d'Ivoire	LB	Liban	SR	Suriname		
CM	Cameroun	LR	Libéria	SG	Singapour		
CN	Chine						
CU	Cuba						
CZ	République tchèque						
DE	Allemagne						
DK	Danemark						
EE	Estonie						

INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- κ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs biologiques de NF- κ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides.

10 De nombreuses cellules tumorales ont développé des mécanismes sophistiqués leur permettant de résister à l'effet de certains agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Une des parades actuelles développées par les cliniciens est l'augmentation du dosage de ces médicaments, avec pour conséquence une aggravation des effets secondaires observés chez les patients. Ainsi par exemple, la plupart des leucémies et certains lymphomes sont traités par l'administration d'anthracyclines (daunomycine, dautxorubicine) dont la toxicité se manifeste sur des fonctions vitales (hépatique, cardiaque...)

15 (Gauthier, PH, 1987, Gaz Med Fr, 94:43-49).

20 Le mécanisme d'action de ces médicaments a été bien étudié et aboutit essentiellement à la mort des cellules tumorales par apoptose (Hamun YA, Blood, 89:1845-1853). Pour échapper à l'apoptose, les cellules utilisent une catégorie de protéines codées par des gènes dénommés *multidrug resistant genes* (MDR) qui leur permettent de contrôler l'entrée ou la sortie de différentes molécules (Pastan I, Gottesman MM, 1991, Annu Rev Med, 42:277-286). Dans le cas des agents anticancéreux, ceux-ci sont évacués activement par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1*.

25 Comme tout gène, l'expression des *MDR* est contrôlée par différents facteurs nucléaires. Ainsi, il a été récemment montré que le gène *MDR1* possédait dans sa partie régulatrice des sites de fixation du facteur NF- κ B (Zhou G, Kuo MT, 1997, J Biol Chem, 272:15174-15183). Ce facteur nucléaire, qui par ailleurs joue un rôle considérable dans de nombreuses situations inflammatoires (Barnes PJ, Karin M, 1997, N Engl J Med, 336:1066-1071) participerait à l'activation du gène *MDR1*.

30 Plusieurs travaux récents ont établi un lien entre l'inhibition de l'activation de NF- κ B et la potentialisation de l'apoptose. Dans les premières expériences rapportées (Wang CY et coll., 1996, Science, 272:784-786, Van Antwerp DJ et coll., 1996, Science, 272:787-789) les auteurs ont validé leurs données en utilisant des lignées manipulées génétiquement pour obtenir l'inhibition ou la

surexpression de l'activité NF- κ B. Ceci ne permet donc pas d'en tirer directement des applications thérapeutiques.

5 Dans une autre étude, les auteurs ont testé les effets de différents inhibiteurs de protéases empêchant l'activation de NF- κ B (pyrrolidine dithiocarbamate, N-tosyl-L-lysyl chlorométhylcétone, N-acétyl cystéine) sur une lignée de macrophages murins (Mannick EE et coll., 1997, Mediators of Inflammation, 6:225-232). Les auteurs de cet article concluent sur le lien possible entre l'inhibition de NF- κ B et l'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et immunes.

10 Enfin, une autre approche axée sur l'inhibition des effets inflammatoires de NF- κ B, a consisté à surexprimer l'inhibiteur naturel de NF- κ B, la molécule I κ B, par thérapie génique (Makarov SS et coll., 1997, Gene Ther, 4:846-852). Cette technologie est encore au stade de développement du fait de la complexité de la vectorisation nécessaire à son bon fonctionnement.

15 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs de nouveaux effets de l'hormone de croissance humaine (hGH), dénommée également somatotropine, à savoir d'une part que l'hGH, et autres composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I, sont des inhibiteurs de l'activation de NF- κ B par une molécule cytotoxique, et, d'autre part que l'hGH, et autres composés susmentionnés, permettent de potentialiser les effets de molécules cytotoxiques et donc de réduire les concentrations de ces dernières dans le cadre de traitements thérapeutiques.

20 Tout d'abord, les Inventeurs ont observé que les monocytes humains répondaient moins à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) quand ils étaient cultivés en présence d'hGH recombinante exogène. Les Inventeurs en ont conclu que l'hGH inhibait l'activation de NF- κ B après stimulation par les LPS (Haefliger A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314).

25 Puis, les Inventeurs ont mis en évidence que les monocytes humains mouraient après le pompage (ou l'engagement) de la molécule de surface APO1/CD95/Fas, et ont montré que l'hGH diminue la mort médiée à travers la molécule Fas, en augmentant la synthèse d'un proto-oncogène antiapoptogène, Bcl-2.

30 Enfin, les Inventeurs ont étudié les effets de l'hGH sur la réponse au TNF- α car Fas et le récepteur p55 du TNF- α appartiennent à la même famille des récepteurs de croissance nerveuse. La lignée leucémique promyéloïde humaine U937 a été utilisée pour réaliser ce travail, du fait de l'insensibilité des monocytes humains à la mort médiée par le TNF- α . L'obtention de résultats

inverses à ceux observés avec Fas, à savoir que l'hGH accélère la mort des cellules médiée par le TNF- α , a permis aux Inventeurs de conclure sur l'effet inhibiteur de l'hGH sur l'activation de NF- κ B par le TNF- α ou par d'autres molécules cytotoxiques activant NF- κ B, telle que la daunomycine.

Ainsi, la présente invention a pour but de fournir une nouvelle méthode de traitement des cancers, et plus particulièrement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, offrant l'avantage d'améliorer à la fois la réponse des malades à certains traitements anticancéreux et également, potentiellement, l'état général du malade.

L'invention a également pour but de fournir de nouveaux produits destinés au traitement desdites pathologies, présentant à la fois l'avantage d'augmenter la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie, et celui d'améliorer l'état général des patients. Les nouveaux produits de l'invention permettent de diminuer l'activation du facteur NF- κ B par l'intermédiaire du composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B utilisé, tel que l'hormone de croissance humaine, ce qui est susceptible d'entraîner l'inhibition de la transcription des gènes *MDR* et donc un renforcement des effets cytotoxiques des agents antitumoraux utilisés, avec pour conséquence attendue la diminution du dosage de ces médicaments antitumoraux.

L'invention a pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de NF- κ B, pour la préparation de médicaments destinés à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, ces phénomènes de résistance apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

Par composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B (encore désignés composés inhibiteurs de NF- κ B), on entend tout composé capable d'inhiber dans les cellules de l'organisme, l'activation de NF- κ B faite par des molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, et donc tout composé capable d'inhiber la synthèse de protéines (telle que la P-gp) permettant aux cellules d'évacuer ces molécules avant qu'elles n'aient pu atteindre leurs cibles moléculaires.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, lesdites molécules cytotoxiques étant susceptibles d'activer le facteur NF- κ B.

Avantageusement, les composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B utilisés dans le cadre de la présente invention, sont des composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme. De préférence, lesdits composés sont choisis parmi ceux se liant aux récepteurs susmentionnés dont les séquences en acides aminés des parties transmembranaires, intracytoplasmiques et extramembranaires présentent une homologie d'environ 50 % à environ 70 %.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, choisis parmi l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6, d'origine humaine ou autres mammifères.

De préférence, lesdits composés sont choisis parmi l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou, avantageusement, de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore l'utilisation susmentionnée de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification...

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament administrable par voie parentérale (IM, IV, SC), notamment à raison :

- d'environ 2 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'hormone de croissance humaine,
- d'environ 150 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'érythropoïétine humaine.

Parmi les molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B utilisées en association avec lesdits composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
- les vinka-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

Avantageusement, le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

A titre d'illustration :

- la posologie journalière usuelle de la daunomycine ou la doxorubicine étant de 40 à 60 mg/m², la posologie de ces dernières dans le cadre la présente invention est d'environ 5 à 30 mg/m².

- la posologie journalière usuelle de la vinblastine étant de 5 à 7 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 1 à 4 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle de la vincristine étant de 1 à 2 mg/m², la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 0,1 à 1 mg/m²,

- la posologie journalière usuelle du taxol étant d'environ 75 mg/m², la posologie de ce dernier dans le cadre la présente invention est d'environ 15 à 35 mg/m².

Parmi les cancers susceptibles d'être traités dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement :

- les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes,
- les tumeurs solides telles que celles de l'ovaire, ou du sein.

L'invention a également pour objet tout produit contenant :

- un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I tels que définis ci-dessus,
 - et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B,
- en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention de l'apparition, ou pour le traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κ B.

L'invention concerne plus particulièrement tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6.

Des produits particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux comprenant à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'hormone de croissance et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- l'hormone de croissance et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol,
- l'érythropoïétine et la daunomycine ou la daunomycine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou daunorubicine,
- l'érythropoïétine et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,
- l'érythropoïétine et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 0,1 à 1 mg/m² de vincristine,
- l'érythropoïétine et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 15 à 35 mg/m² de taxol.
- L'invention est illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'effet *in vitro* de l'hormone de croissance et de l'érythropoïétine sur des lignées cellulaires tumorales.

1) Exemple n°1 :

- Un gène de sélection (*neomycin resistant*, Neo^R) et le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été co-transfectés dans la lignée leucémique promyéloïde humaine U937. En comparant la lignée transfectée U937-hGH (qui produit de façon constitutive l'hGH à des doses physiologiques), soit à la lignée parentale U937, soit à une lignée transfectée avec Neo^R seul, on observe par différentes approches méthodologiques que la lignée U937-hGH meurt davantage sous l'effet du *tumor necrosis factor* (TNF- α). Cette cytokine sécrétée par différents types de cellules immunes possède une activité antitumorale (Harakana, K et coll., 1984, Int J Cancer, 34:263-267) et est capable de promouvoir l'activation de NF- κ B (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179).
- Les cellules U937-hGH et les cellules contrôles U937-Neo ont été mises en culture pendant 48 heures en présence de concentrations croissantes de TNF- α

- l'hormone de croissance humaine telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou, avantageusement, l'hormone de croissance humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

L'invention concerne également tout produit tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

- les cytokines,
 - les anthracyclines, dont la daunomycine, la daunorubicine,
 - les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
 - la paclitaxèle (ou Taxol, DCI).
- Des produits tels que définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention, sont caractérisés en ce qu'ils contiennent :
- l'hormone de croissance et la daunomycine ou la daunorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 5 à 30 mg/m² de daunomycine ou daunorubicine,
 - l'hormone de croissance et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 1 à 4 mg/m² de vinblastine,

recombinant. A l'issue de cette culture, les cellules lavées ont été incubées en présence d'iode de propidium qui s'incorpore dans l'ADN des cellules mortes. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

La Figure n°1 montre l'augmentation de l'incorporation d'iode de propidium en fonction des doses croissantes de TNF- α exprimées en unités internationales (UI). Pour les cellules U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH), avec l'augmentation de la concentration de TNF- α on observe une légère augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes (donc mortes) due à l'incorporation d'iode de propidium (fluorescence rouge). Cette figure met par contre bien en évidence le fait que ces valeurs sont beaucoup plus élevées pour la lignée U937-hGH, en fonction des doses croissantes de TNF- α ajoutées au milieu de culture.

Il est ainsi démontré que la présence dans les cultures cellulaires d'hGH produite par les lignées U937 transfectées avec le gène de l'hGH, augmente leur susceptibilité à l'induction de mort médiée par le TNF- α .

2) Exemple n°2 :

Ayant rapporté dans une étude précédente que l'hGH pouvait intervenir dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B médiée par les lipopolysaccharides (Haefliger A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314), les Inventeurs ont étudié le statut de NF- κ B lors de la stimulation des différentes lignées par le TNF- α .

La Figure n°2 représente le résultat d'une analyse par gel retard. Sur ce gel ont été déposés des extraits nucléaires provenant des cellules U937-hGH et U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH) soumises à différents inducteurs dont le TNF- α ou le TNF- α et la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Cette expérience indique clairement que la présence de NF- κ B dans les noyaux des cellules U937-hGH est diminuée par rapport aux cellules contrôles.

La présence de NF- κ B est attestée sur les lignes 4 et 5 qui représentent la migration des extraits nucléaires de cellules U937 stimulées par le TNF- α , et pré-incubées, soit avec une sonde froide NF- κ B mutée qui ne déplace pas le signal (ligne 4), soit avec une sonde froide NF- κ B homologue qui inhibe le signal (ligne 5).

La Figure n°3 représente le résultat d'un enzyme immunoassay (ELISA) réalisé avec le lysat de cellules U937-hGH et U937-Neo transfectées de façon

transitoire avec un plasmide contenant des séquences NF- κ B dans le promoteur du gène rapporteur codant pour la chloramphenicol-acetyl-transférase (CAT) (Chiao P et coll., 1994, Proc Natl Acad Sci USA, 91:28-32).

Les cellules sont transfectées par électroporation puis incubées avec le TNF- α . A l'issue de la culture, les cellules sont lysées et l'activité CAT est mesurée par un ELISA commercial (Boehringer-Mannheim), selon les recommandations du fournisseur.

La figure montre que l'activité CAT, reflet de la présence de NF- κ B, est diminuée dans les cellules U937-hGH par rapport aux cellules contrôles, après stimulation par le TNF- α .

Les résultats présentés dans les Figures 2 et 3 démontrent donc par deux approches méthodologiques différentes, que la synthèse de NF- κ B est diminuée dans U937-hGH par rapport à la lignée contrôle.

3) Exemple n°3 :

L'utilisation du TNF- α étant très difficile en clinique humaine du fait des effets secondaires adverses, les Inventeurs se sont intéressés à la daunomycine. Cette anthracycline utilisée en thérapie anticancéreuse sous le nom de Cerubidine[®] agit en s'intercalant dans les séquences de l'ADN cellulaire, perturbant de ce fait le fonctionnement cellulaire. Tout comme le TNF- α (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179), la daunomycine active NF- κ B (Das KC, White CW, 1997, J Biol Chem, 272:14914-14920).

La Figure 4 indique que la lignée U937-hGH est également plus sensible que la lignée contrôle à la mort médiée par la daunomycine.

4) Exemple n°4 :

Pour tester la possibilité d'utiliser l'objet de la présente invention sur des tumeurs non lymphoïdes, les Inventeurs ont utilisé l'hGH pour essayer d'inverser le phénotype "adriamycine résistant" de cellules isolées à partir d'un adénocarcinome ovarien humain IGROV/ADR (Bénard J et coll., 1985, Cancer Res, 45:4970-4979).

Comme illustré par la Figure 5, ces cellules sont insensibles à l'effet toxique de la daunomycine ajoutée à la culture (groupes hGH 0 ng/ml). L'adjonction d'hGH recombinante (Salzen R, laboratoire Sero) rend ces

Légendes des figures :

- Figure 1 : Effet de l'hormone de croissance sur la mortalité des cellules exposées au TNF- α : le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les concentrations de TNF- α sont indiquées en abscisse en UI/ml.

- Figure 2 : Effet de l'hormone de croissance sur la translocation de NF- κ B ; la colonne 1 correspond aux cellules U937 de contrôle, la colonne 2 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 3 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α , la colonne 4 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B mutée, la colonne 5 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- α + une sonde NF- κ B homologue, la colonne 6 correspond aux cellules U937-hGH de contrôle, la colonne 7 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α + cycloheximide, la colonne 8 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- α ; la présence de NF- κ B est indiquée par une flèche.

- Figure 3 : Effet de l'hormone de croissance sur l'activité rapporteur CAT ; le pourcentage de variation de l'activité CAT est indiqué en abscisse ; les deux colonnes de gauche représentent les deux expériences effectuées sur les cellules U937-Neo, et les deux colonnes de droite représentent les deux expériences indépendantes effectuées sur les cellules U937-hGH.

- Figure 4 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les pourcentages indiqués montrent l'augmentation de la mortalité des cellules ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

- Figure 5 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose de la lignée IGROV/ADR, induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les différentes colonnes correspondant aux différentes concentrations d'hGH utilisées (0, 5, 50, 500, 1000 ng/ml) ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μ M.

cellules sensibles à la daunomycine, avec un effet maximal observé pour la plus faible dose d'hGH utilisée ici, soit 5 ng/ml.

Ce résultat prouve d'une part que des résultaits d'aggravation de mortalité peuvent être obtenus aussi bien avec de l'hGH exogène recombinant qu'avec les lignées transfectées ausmentionnées, et que d'autre part, la présente invention peut s'appliquer à des tumeurs solides non lymphoïdes.

5) Exemple n°5 :

L'érythropoétine (EPO), une autre molécule que hGH appartenant à la même famille des cytokines de classe I, a été testée sur des cellules de carcinome rénal humain (RCC) HIEG.

4.10⁴ cellules RCC ont été transfectées de façon transitoire à l'aide d'un kit Efficient[®], soit avec 3 μ g d'un plasmide portant le gène codant pour EPO (cellules RCC-EPO), soit avec 3 μ g d'un plasmide codant pour la résistance à la néomycine (cellules RCC-Neo) comme contrôle négatif. 48 heures après, les RCC ont été mises en présence de daunomycine à deux concentrations différentes : 0,3 et 0,6 μ M. Le nombre de cellules survivantes a été mesuré 48 heures plus tard par cytométrie en flux (Figure 6).

Les résultats de l'expérience 1 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0 μ M	14745	26911
daunomycine 0,3 μ M	11382	3487
daunomycine 0,6 μ M	10179	8551

Les résultats de l'expérience 2 exprimés en nombre de cellules vivantes sont les suivants :

	RCC-Neo	RCC-EPO
daunomycine 0 μ M	20150	29102
daunomycine 0,3 μ M	8891	2693
daunomycine 0,6 μ M	7001	4739

Les résultats montrent que dans deux expériences différentes (expériences 1 et 2), la présence conjointe de daunomycine et d'EPO aggrave sensiblement la mortalité cellulaire, avec un effet plus marqué pour la plus faible dose de daunomycine utilisée.

- Figure 6 : Effet de l'érythropoïétine sur l'apoptose de la lignée de carcinome rénal humain HIEG, induite par la daunomycine : pour chacune des expériences 1 et 2, le nombre de cellules vivantes est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules RCC-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules RCC-EPO ; les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en μM .

5

REVENDICATIONS

1. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation du facteur nucléaire κB (NF- κB), pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, et à la prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- κB .

10

2. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κB selon la revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées et susceptibles d'activer le facteur NF- κB .

15

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κB se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, tels que les composés choisis parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

20

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :
- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,
- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2,

25

30

35

et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

- 5 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :
- de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification..

- 10 - ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

- 15 6. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 7, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- κ B choisies parmi :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
- les vincas-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

- 20 7. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- κ B selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

- 25 8. Produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- κ B, un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, choisi notamment parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

- 10 10. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

- 25 11. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification..

- 30 - ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,

et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- κ B.

12. Produit selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- κ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :
- les cytokines,
 - les anthracyclines, dont la daunomycine, la doxorubicine,
 - les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
 - la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

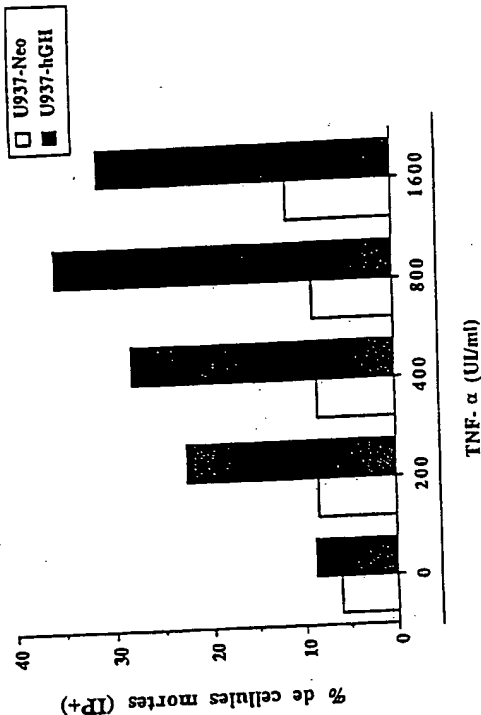


FIGURE 1

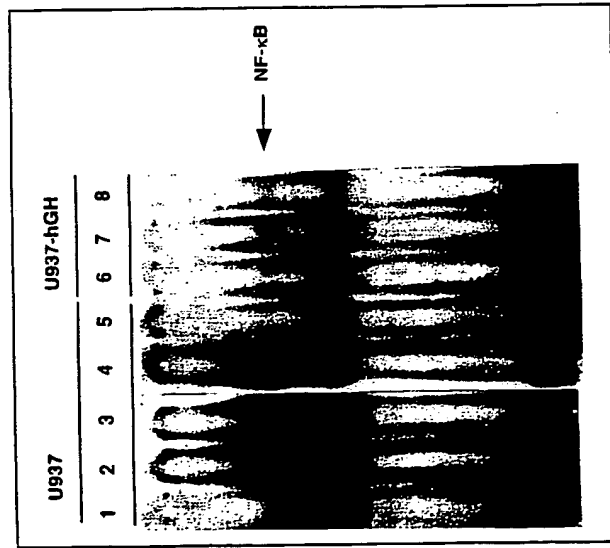


FIGURE 2

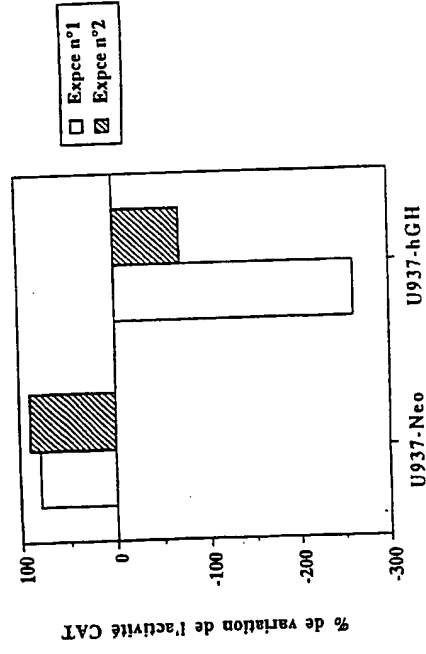


FIGURE 3

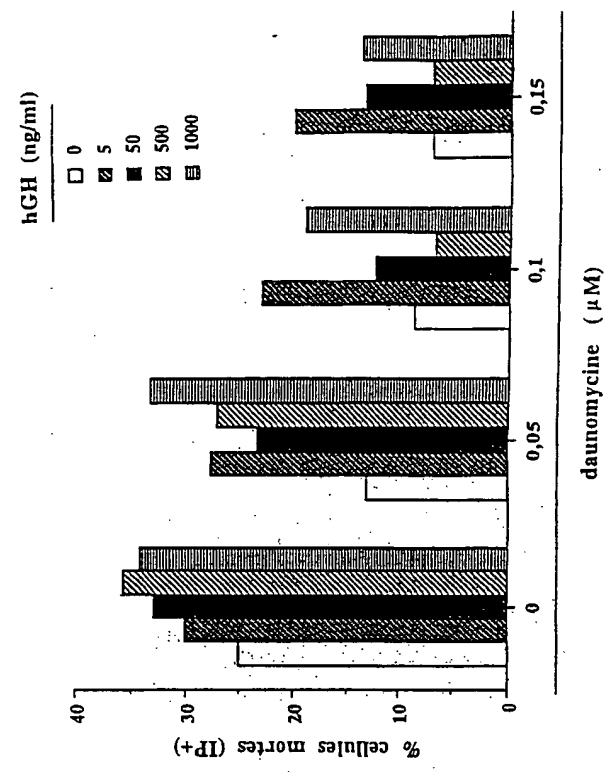


FIGURE 5

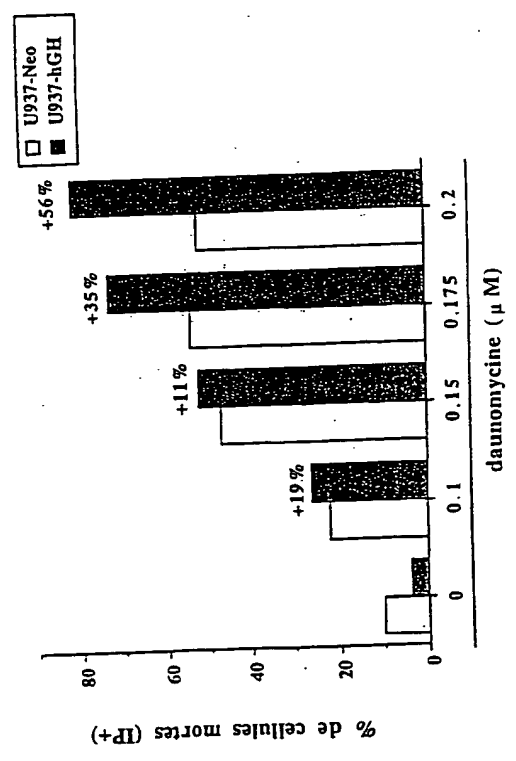
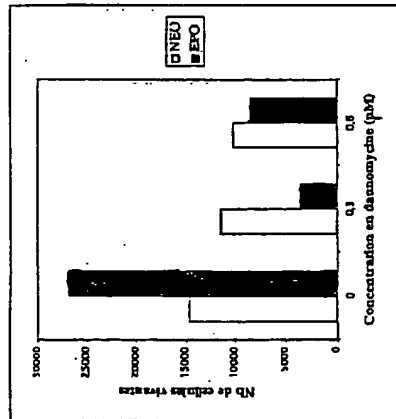


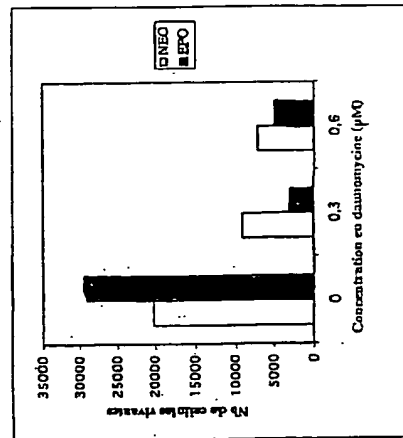
FIGURE 4

Figure 6

Expérience 1



Expérience 2



LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- (B) RUE: 3, rue Michel-Ange
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

10

- (ii) TITRE DE L' INVENTION: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF-KB, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACOLOGIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: Patentin Release #1.0, Version #1.30 (OSB)

20

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 609 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

35

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLB: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..609

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG OCT TTT GGC CTG CTC
45 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

48

TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA
Cys Leu Pro Tip Leu Gln Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

96

TCC AGG CTT TTT GAC AAC OCT AGT CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

144

55

		2		3		30	
CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT		192		20		25	
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys				35		40	
5				Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln		45	
TTC TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG		240		Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys		50	
Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Thr Gln Gln				55		60	
65				10 Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Thr Gln Gln		75	
Lys Ser Asn Leu Glu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser		288		Lys Ser Asn Leu Glu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser		90	
15				15 Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu		105	
TGG CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTC AGG AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG		336		Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu		120	
15				20		125	
GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA		384		Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro		140	
Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu				25		145	
20				Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn		155	
GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC		432		Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys		170	
Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro				30		180	
130				Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln		190	
CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC ACG AAG TTC GAC ACA AAC		480		Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe		200	
Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn				35		195	
145				TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG GGC ATC GTG CAG		180	
30				35		185	
TCA CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TCC		528		TGC CCG TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG		200	
Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys				40		195	
165				(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:			
TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG GGC ATC GTG CAG		576		(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:			
35				(A) LONGUEUR: 203 acides aminés			
Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln				(B) TYPE: acide aminé			
180				(D) CONFIGURATION: linéaire			
TGC CCG TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG		609		(11) TYPE DE MOLECULES: protéine			
Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe				(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:			
40				Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu		1	
195				5		10	
				55		15	
				Cys Leu Pro Trp Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu		48	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.